7 月 July
2020, 63(7): 788－797
昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA
http://www.insect.org.cn
doi: 10.16380/j.kcxb.2020.07.002

沙葱萤叶甲表皮蛋白基因的鉴定及表达谱分析

段天凤[1], 李 玲[1], 马红悦[1], 庞保平[1,*], 单艳敏[2], 张卓然[2]

(1. 内蒙古农业大学草原昆虫研究中心, 呼和浩特 010020; 2. 内蒙古自治区草原工作站, 呼和浩特 010020)

摘要:【目的】表皮蛋白是昆虫体壁的主要组成部分,在昆虫生长发育中起着重要的作用。本研究旨在鉴定沙葱萤叶甲 *Galeruca daurica* 表皮蛋白基因,分析其表达模式,以期为进一步研究其在沙葱萤叶甲生长发育中的作用提供必要的基础。【方法】根据本实验室组装的沙葱萤叶甲转录组测序数据,应用生物信息学方法鉴定表皮蛋白基因全长开放阅读框(ORF);采用 RT-qPCR 技术测定鉴定的 8 个表皮蛋白基因在沙葱萤叶甲不同发育阶段和 3 龄幼虫不同组织(头部、体壁、消化道和脂肪体)中的表达谱。【结果】基于转录组数据鉴定到 8 条沙葱萤叶甲表皮蛋白基因的开放阅读框(ORF)全长序列,命名为 *GdauCP*1－8(GenBank 登录号: MN629000－MN629007),ORF 长 417～810 bp,编码138～269 个氨基酸,预测分子量为 15～28 kD,等电点 pI 为 4.45～8.62;具有 16～20 个氨基酸的信号肽;GdauCP1 具有典型的跨膜结构,其余 7 个 GdauCP 蛋白无跨膜结构。同源序列比对和系统发育分析表明,GdauCP3 与马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* CP 的氨基酸序列一致性最高,为 60.00%;其余的 GdauCPs 与玉米根萤叶甲 *Diabrotica virgifera virgifera* CP 的氨基酸序列一致性最高,为 58.52%～80.00%。GdauCP1－4 属于 RR-2 亚家族,GdauCP5－7 属于 RR-1 亚家族,GdauCP8 的亚家族归属未确定。RT-qPCR 分析表明,8 个 *GdauCP* 基因在沙葱萤叶甲不同发育阶段及 3 龄幼虫不同组织内均有表达,且表达量存在显著差异。*GdauCP*2, *GdauCP*4, *GdauCP*5 和 *GdauCP*6 在 1 龄幼虫期高表达,*GdauCP*3, *GdauCP*7 和 *GdauCP*8 在蛹期高表达,*GdauCP*1 在 3 龄第 3 天幼虫期高表达;除 *GdauCP*2 在成虫中表达水平较高外,其他 *GdauCP* 基因在成虫中的表达水平均很低。*GdauCP*1 在头部和体壁中高表达,*GdauCP*2 和 *GdauCP*8 在脂肪体中高表达,*GdauCP*3, *GdauCP*4, *GdauCP*6 和 *GdauCP*7 在消化道中高表达,而 *GdauCP*5 在体壁中高表达。【结论】8 个 *GdauCP* 基因在沙葱萤叶甲不同发育阶段和组织间差异表达,且表达模式不同,意味着不同 GdauCP 可能具有不同的功能。

关键词: 沙葱萤叶甲; 表皮蛋白; 基因克隆; 生物信息学; 表达谱; RT-qPCR

中图分类号: Q966　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 0454-6296(2020)07-0788-10

Identification and expression profiling of cuticular protein genes in *Galeruca daurica* (Coleoptera: Chrysomelidae)

DUAN Tian-Feng[1], LI Ling[1], MA Hong-Yue[1], PANG Bao-Ping[1,*], SHAN Yan-Min[2], ZHANG Zhuo-Ran[2] (1. Research Center for Grassland Entomology, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010020, China; 2. Grassland Station of Inner Mongolia, Hohhot 010020, China)

Abstract:【Aim】Cuticular proteins, the main components of insect integument, play an important role in the development of insects. This study aims to identify cuticular protein genes from *Galeruca daurica* and to analyze their expression patterns, so as to lay a necessary foundation for investigation on their functions in the growth and development of *G. daurica*.【Methods】The complete open reading frame

基金项目: 国家自然科学基金项目(31760517)
作者简介: 段天凤, 女, 1993 年 3 月生, 内蒙古乌海人, 博士研究生, 研究方向为昆虫生态与分子生物学, E-mail: 905610650@qq.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: pangbp@imau.edu.cn
收稿日期 Received: 2019-11-29; 接受日期 Accepted: 2020-01-08

(ORF) sequences of cuticular protein genes were identified from *G. daurica* by bioinformatics methods according to the sequence information available in the transcriptome data assembled by our laboratory, and the expression profiles of the eight cuticular protein genes identified at different developmental stages and in different tissues (head, integument, digestive tract and fat body) of the 3rd instar larvae were detected by RT-qPCR. 【Results】The complete ORF sequences of eight cuticular protein genes were identified from the transcriptome data of *G. daurica*, and named *GdauCP*1 – 8 (GenBank accession numbers: MN629000 – MN629007). The ORFs of *GdauCP*1 – 8 are 417 – 810 bp in length, encoding eight proteins of 138 – 269 amino acids with the predicted molecular weight of 15 – 28 kD and pI of 4.45 – 8.62. The encoded proteins have signal peptides with 16 – 20 amino acids. GdauCP1 has a typical transmembrane domain, while the other seven GdauCPs do not have. Homologous sequence alignment and phylogenetic analysis showed that GdauCP3 has the highest amino acid sequence identity (60.00%) with *Leptinotarsa decemlineata* CP, while the other GdauCPs have the highest amino acid sequence identities (58.52% – 80.00%) with *Diabrotica virgifera virgifera* CPs. GdauCP1 – 4 belong to the subfamily RR-2, GdauCP5 – 7 belong to the subfamily RR-1, and the subfamily identity of GdauCP8 was not defined. The RT-qPCR results showed that all of the eight *GdauCP* genes were significantly differentially expressed at different development stages and in different tissues of the 3rd instar larvae of *G. daurica*. *GdauCP*2, *GdauCP*4, *GdauCP*5 and *GdauCP*6 were highly expressed in the 1st instar larva, *GdauCP*3, *GdauCP*7 and *GdauCP*8 had high expression levels in the pupa, and *GdauCP*1 was highly expressed in the day-3 3rd instar larva. Except for the higher expression level of *GdauCP*2 in the adult, the other *GdauCP* genes had lower expression levels in the adult. *GdauCP*1 was highly expressed in the head and integument, and *GdauCP*2 and *GdauCP*8 had high expression levels in the fat body. *GdauCP*3, *GdauCP*4, *GdauCP*6 and *GdauCP*7 were highly expressed in the digestive tract, while *GdauCP*5 was highly expressed in the integument. 【Conclusion】The expression levels of the eight *GdauCP* genes significantly differ in different developmental stages and larval tissues of *G. daurica* with different expression patterns, implying that different GdauCPs may have distinct functions.

Key words: *Galeruca daurica*; cuticular protein; gene cloning; bioinformatics; expression profiling; RT-qPCR

昆虫表皮具有保护内脏、防止水分蒸发、抵御外部有毒物质和微生物等作用，主要由几丁质和表皮蛋白(cuticular protein, CP)组成。不同类型昆虫表皮的几丁质种类无明显差异，但表皮蛋白会随着昆虫种类、发育阶段、组织特异性的不同而有差异，所以表皮蛋白的种类和数量变化是影响表皮结构及其机械性能的主要因素(Andersen *at al*., 1995; Cornman and Willis, 2010)。表皮蛋白的组成决定了表皮的机械特性，如弹性和坚硬性(Dittmer *et al*., 2012)。根据几丁结合域(chitin-binding domain, ChtBD)或保守基序，昆虫表皮蛋白主要分为 12 个家族：CPR, CPF, CPFL, TWDL (Tweedle), CPAP1, CPAP3, CPG, CPLCA, CPLCG, CPLCP, CPLCW 和 Apidermin(Willis, 2010)。昆虫基因组分析表明，表皮蛋白基因约占编码蛋白基因的 1%，意味着表皮蛋白在昆虫生长、繁殖、环境适应等过程中可能起着重要作用(Futahashi *et al*., 2008; Ioannidou *et al*., 2014)。目前在基因组、转录组和蛋白组水平上已有 20 多种昆虫的表皮蛋白被鉴定和分析(Liu *et al*., 2019; Volovych *et al*., 2019)。然而，表皮蛋白的种类和特征在昆虫种类之间差异很大，从体虱 *Pediculus humanus corporis* 的 63 种到埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 的 305 种，而且主要集中于双翅目和鳞翅目昆虫(Ioannidou *et al*., 2014)。

沙葱萤叶甲 *Galeruca daurica* 是近年来在内蒙古草原猖獗发生的一种新害虫，主要取食沙葱 *Allium mongolium*、野韭 *A. ramosum*、多根葱 *A. polyrhizum* 等百合科葱属 *Allium* 植物。该虫自 2009 年在内蒙古草原上突然暴发成灾以来，目前发生范围已从 2009 年锡林郭勒盟的 4 个旗扩散到锡林郭勒盟、乌兰察布市、呼伦贝尔市、巴彦淖尔市、鄂尔多斯市和阿拉善盟 6 个盟市的 20 多个旗县(内蒙古自

治区草原工作站内部资料)，危害日趋严重，不仅严重影响草原畜牧业生产和牧民的生活，而且使当地本已脆弱的草原生态环境更加恶化。该虫一年发生1代，以卵滞育越冬，以成虫滞育越夏(吴翔等，2015)。单艳敏等(2019)应用 RACE 技术克隆了一个沙葱萤叶甲表皮蛋白基因 *GdAbd*，并测定了其对温度胁迫的响应。本研究基于本实验室组装的沙葱萤叶甲转录组数据，拟对沙葱萤叶甲表皮蛋白基因进行进一步的鉴定和生物信息学分析，并对鉴定的8个代表性表皮蛋白基因在不同发育阶段及幼虫不同组织中表达谱进行分析，以期为进一步研究表皮蛋白在沙葱萤叶甲生长发育以及抵抗环境胁迫中的作用奠定必要的基础。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

2019 年 3 月将越冬卵置于温度 25 ± 1℃、相对湿度 70% ±5%、光周期为 14L∶10D 的人工气候箱进行孵育，以野韭饲喂。选取沙葱萤叶甲不同发育阶段整个虫体样品以及解剖获得 3 龄幼虫不同组织样品用于后续实验。

1.2 主要试剂和仪器

RNA 提取试剂盒 TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit, Premix Taq™ (TaKaRa Taq™ Version 2.0 Plus Dye), PrmerScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit, pMD19-T Vector Cloning Kit, D500 DNA Marker, DL2000 DNA Marker, 大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α 感受态细胞均购自大连宝生物工程有限公司；Go Taq® qPCR Master Mix 购自 Promega 公司；核酸琼脂糖凝胶回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司；引物合成及序列测定由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。其他试剂为国产分析纯试剂。普通 PCR 仪(T100 Thermal Cycler, Bio-Rad, 美国)；荧光定量 PCR 仪(FTC-3000P, Funglyn Biotech, 加拿大)；超微量分光光度计(NanoPhotometer™ P-Class, 德国)；智能型人工气候箱(PRX-350C，宁波海曙赛福实验仪器厂)。

1.3 沙葱萤叶甲表皮蛋白的鉴定与分析

利用关键词“cuticular protein”和“cuticle”在本实验室组装的沙葱萤叶甲幼虫和成虫转录组数据库进行直接检索，筛选候选表皮蛋白基因。将检索得到的序列在 NCBI 网站进行 Blast 验证，去除无注释信息或者注释信息非表皮蛋白的序列，去除 E 值大于 1×10^{-5} 的序列，最后去除重复序列后，利用 ORF Finder (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html)查找候选基因序列的开放阅读框，推测编码氨基酸序列。分别利用 SMART 和 CutProtFam-Pred (http://aias.biol.uoa.gr/CutProtFam-Pred/search.php)(Karouzou *et al*., 2007; Ioannidou *et al*., 2014)对序列保守结构域进行鉴定及家族分类。

1.4 沙葱萤叶甲表皮蛋白基因的克隆和测序

根据沙葱萤叶甲转录组数据，共筛选出 134 条注释为表皮蛋白的 unigene 序列，通过生物信息学分析，选取 8 条位于不同系统发育树分支上具有完整 ORF 的表皮蛋白基因片段进行克隆。利用 Primer Premier 5.0 软件设计 8 对引物(表 1)，沙葱萤叶甲 3 龄幼虫提取总 RNA 后用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳和超微量分光光度计测定质量和浓度，逆转录生成 cDNA。PCR 反应体系(25 μL)：cDNA 模板(100 ng/μL) 1 μL, 上下游引物(0.2 μmol/L)各 1 μL, GoTaq® qPCR Master Mix 12.5 μL 及 RNase-free Water 9.5 μL。反应程序：94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 2 min, 25 个循环; 72℃ 延伸 7 min。产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测，然后对产物进行回收，与 pMD-19T 载体连接，连接产物转入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中进行转化，吸取转化后产物 200 μL 涂布含有氨苄西林的抗性 LB 平板上，过夜培养 12 ~ 16 h，而后进行蓝白斑筛选。挑取平板上的菌落进行 PCR 鉴定后，将条带清晰、片段长度相符的合格菌落接种于含有 10 mg/mL 氨苄西林 1.0 mL 的 LB 液体培养基中，37℃ 220 r/min 摇床过夜培养 12 ~ 16 h。然后送往生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.5 沙葱萤叶甲表皮蛋白基因的生物信息学分析

将 1.4 节的基因测序结果与转录组数据库中鉴定出的表皮蛋白基因片段序列通过 DNAMAN 软件进行比对。利用 ComputePI/MW (http://web.expasy.org/compute_pi)进行目的基因编码蛋白质的等电点和相对分子量的预测分析；采用 TMHMM Server V. 2.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/)和 SignalP 5.1(http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)软件预测是否具有跨膜域和信号肽；采用 NCBI 中的 BlastP(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)进行氨基酸序列同源性分析。利用在线工具(http://smart.embl-heidelberg.de/)进行蛋白质结构域预测；分别提取 CP 家族保守的结构域序列，利用 ClustalX 进行序列比对后，并用在线

表 1 引物信息
Table 1 Primer information

引物 Primers	引物序列(5′-3′) Primer sequences	引物用途 Primer use
CP1-F	GTTCAGTTTATCAAAAAAGGAAACAA	基因克隆 Gene cloning
CP1-R	TTTACCAAACGTTGTGTGCAACTAC	
CP2-F	ACAATGGCATTCAAATTCATCTGCT	
CP2-R	CAATAATCAACAAAAAACGTGACTCAAA	
CP3-F	ACTTTTGGTATAGACATACACAGCA	
CP3-R	TTTATAATTTAATGGTAATAATGAGCA	
CP4-F	AGTACCAATCTTAGTTTACTCACAG	
CP4-R	AACAGTTCAGACTCTAATGATGATA	
CP5-F	AGGTCAACCGTCATTTAGTTTTTGG	
CP5-R	AATTAACCTAATCCACCTCCAGCGA	
CP6-F	ATAGTTGAAAATTTATCACCATTAC	
CP6-R	ATACAAAAACTGCCATATATCTATA	
CP7-F	ATGAGAATAGCCATAGTGATTGCAC	
CP7-R	TCAGTATCTTTTTCCAGAGGACGAT	
CP8-F	TTGAAGTGTAAAGCATAGTCTTCTA	
CP8-R	TTAATAATGATAGTATCCTGGATGT	
Q-CP1-F	TGCCGTTGCACCAGTAGTAG	RT-qPCR 中目的基因扩增 Amplification of target genes in RT-qPCR
Q-CP1-R	AGCAGTCCATGGAGCAGAGT	
Q-CP2-F	CTGCCACATACCAAGCAAAA	
Q-CP2-R	GCAGGCTGAGCGTAGGTAAC	
Q-CP3-F	ACACTGCCGATCCTATCCAC	
Q-CP3-R	AGCAACTGGAGCAGCGTATT	
Q-CP4-F	TCGCTGACAACGGTCACTAC	
Q-CP4-R	TGGAGCAGCATGTTGGTAAG	
Q-CP5-F	ACGGCAATCAGAGGTACGAG	
Q-CP5-R	AGAATACTCCGTCGGGACCT	
Q-CP6-F	TGAAGGAGTGAACGCTGATG	
Q-CP6-R	AATTGCTGGAGGAATTGGTG	
Q-CP7-F	GTTTTGAAAAACGCCGGTAA	
Q-CP7-R	GGAATTGGTGGAGGTGTGTT	
Q-CP8-F	TCTGGATACGGACATGGTCA	
Q-CP8-R	CAGATGGCGCAGCAGTATAA	
Q-SDHA-F	GGGAGACCACAATCTCCTCA	RT-qPCR 中内参基因扩增 Amplification of the reference gene in RT-qPCR
Q-SDHA-R	AGCTGGTGCTCCTAAGTCCA	

WebLogo 工具(http://weblogo.berkley.edu/logo.cgi)绘出结构域 LOGO 图并分析序列特征及其保守氨基酸出现的频率；利用 Mega 6.0 软件中的邻接法(neighbor-joining method, NJ method)构建系统进化树，重复运行 1 000 次。

1.6 沙葱萤叶甲表皮蛋白基因表达谱的 RT-qPCR 分析

按照 TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit 的操作步骤，提取沙葱萤叶甲不同发育阶段(1 龄第 3 天幼虫 15 头，2 龄第 3 天幼虫 7 头，3 龄第 3，5，7 和 9 天龄幼虫及 7 日龄蛹及羽化当天雌、雄成虫各 3 头为 1 个生物学重复，3 个重复)整个虫体样品的总 RNA，使用超微量分光光度计和 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定提取的总 RNA 纯度和质量。按照 PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit 操作说明反转录合成 cDNA 第 1 链，稀释 10 倍作为 RT-qPCR 分析的模板。以沙葱萤叶甲 *SDHA*(GenBank 登录号：KU240575)为内参基因(Tan *et al*., 2017)(表 1)，以 3 龄第 3 天幼虫的基因表达量作为对照，qPCR 方法测定表皮蛋白基因在沙葱萤叶甲不同发育阶段的表达水平。反应体系(10 μL)：模板 1 μL，上下游引物(10 μmol/L)各 0.2 μL，Go Taq® qPCR Master Mix 5 μL，Nuclease-Free Water 3.6 μL。采用两步法 PCR 程序进行反应，反应程序：95℃预变性 10 min；95℃变性 15 s，60℃退火 1 min，共 40 个循环；95℃ 15 s，60℃ 15

s, 95℃ 15 s。

3 龄幼虫体型较大,为便于解剖,选取沙葱萤叶甲 3 日龄 3 龄幼虫进行不同组织表达谱分析。按照 1.4 节方法提取生成不同组织(头部、体壁、消化道和脂肪体)的 cDNA,稀释 10 倍后作为 qPCR 分析的模板,qPCR 内参基因和方法同上,基因相对表达量计算时以头部的基因表达量作为对照。

1.7 数据分析

采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法(Livak and Schmittgen, 2001)分析沙葱萤叶甲表皮蛋白基因的相对表达量,不同发育阶段及 3 龄幼虫不同组织相对表达量差异显著性分析采用单因素分析法(one-way ANOVA, Duncan 氏新复极差法)。利用 DPS15.0 数据处理系统对数据进行统计分析,数据以平均数 ± 标准误表示。

2 结果

2.1 沙葱萤叶甲表皮蛋白基因的鉴定与序列分析

从沙葱萤叶甲转录组数据库共检索得到 134 个注释信息为表皮蛋白的序列,选取 8 条具有完整开放阅读框(ORF)的表皮蛋白基因,命名为 *GdauCP*1 – 8(GenBank 登录号: MN629000 – MN629007)。以沙葱萤叶甲 cDNA 为模板,利用设计的引物,进行中间片段的扩增,获得预期大小的目的片段,测序结果与转录组数据比对一致。8 条 ORF 长度为 417 ~ 810 bp,编码 138 ~ 269 个氨基酸残基,分子量范围为 15 ~ 28 kD,等电点为 4.45 ~ 8.62。SignalP 均预测出 16 ~ 20 个氨基酸的信号肽。TMHMM 分析表明 GdauCP1 有典型的跨膜结构,其余表皮蛋白无跨膜区。利用 8 个基因编码的氨基酸序列在 NCBI 上进行 BlastP 比对分析发现, GdauCP3 与马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 表皮蛋白的氨基酸序列一致性最高,为 60.00%;其余 GdauCP 蛋白与玉米根萤叶甲 *Diabrotica virgifera virgifera* 表皮蛋白氨基酸序列一致性最高,在 58.52% ~ 80.00% 之间。

运用 SMART 软件进行分析,发现 GdauCP1 – 7 属于 CPR 家族,都具有典型的 R&R 保守序列结构域 G-x(8)-G-x(6)-Y(x 代表任意氨基酸,数字代表氨基酸数量);*GdauCP*1 – 4 都有低度复杂区且有的具有内部重复;*GdauCP*5 – 7 有的具有低度复杂区但是无内部重复。GdauCP8 不含 ChtBD 结构域,但有两个低度复杂区和 4 个内部重复。将其保守基序进行 WedLogo 分析发现, GdauCP1 – 4 属于 RR-2 亚家族,保守基序为 G-x-Y-L-x(3)-D-G-x(2)-R-x-V-Y-T-x-D-x(3)-G; GdauCP5 – 7 属于 RR-1 亚家族,保守基序为 G-x(8)-G-x(6)-Y-x-A-x(3)-G; GdauCP8 的亚家族归属未确定。

采用从 NCBI 上搜索的 3 种鞘翅目昆虫的 44 条表皮蛋白氨基酸序列构建系统进化树,可以看出分为 3 支, GdauCP1 – 4 聚为一类,该类属于 RR-2 亚家族; GdauCP5 – 7 聚为一支,该类属于 RR-1 亚家族,这两个分支都属于 CPR 家族,所以为一大支; GdauCP8 单独为一类,该结果与 WedLogo 分析结果一致(图 1)。

2.2 沙葱萤叶甲不同发育阶段表皮蛋白基因的表达谱

从图 2 可知, 8 个 *GdauCP* 基因在沙葱萤叶甲不同发育阶段的表达水平均存在显著差异($P < 0.05$),其中 *GdauCP*2, *GdauCP*4, *GdauCP*5 和 *GdauCP*6 在 1 龄幼虫期的表达水平明显高于其他发育阶段,特别是 *GdauCP*4 约为对照 3 龄第 3 天幼虫中表达量的 15 000 倍, *GdauCP*4 和 *GdauCP*5 的表达量在其他发育阶段间无显著差异($P > 0.05$); *GdauCP*3, *GdauCP*7 和 *GdauCP*8 在蛹期的表达水平显著高于其他发育阶段($P < 0.05$),分别约为对照 3 龄第 3 天幼虫的 50, 2 000 和 200 倍,且 *GdauCP*7 和 *GdauCP*8 的表达量在其他发育阶段间无显著差异($P > 0.05$); *GdauCP*1 在 3 龄第 3 天幼虫期表达水平最高,其次为 3 龄第 5 天幼虫期,再次为 2 龄幼虫;除 *GdauCP*2 在成虫中表达水平较高外(约为对照 3 龄第 3 天幼虫的 300 倍),其他 *GdauCP* 基因在成虫中的表达水平均很低。

2.3 沙葱萤叶甲幼虫不同组织中表皮蛋白基因的表达谱

沙葱萤叶甲 *GdauCP* 基因在 3 龄幼虫不同组织间表达水平也存在显著差异($P < 0.05$),其中: *GdauCP*1 在头部和体壁中的表达水平显著高于在消化道和脂肪体中的($P < 0.05$); *GdauCP*2 和 *GdauCP*8 在脂肪体中的表达水平明显高于在其他组织中的($P < 0.05$),其他组织间差异不显著($P > 0.05$); *GdauCP*3, *GdauCP*4, *GdauCP*6 和 *GdauCP*7 在消化道中的表达量最高, *GdauCP*3, *GdauCP*4 和 *GdauCP*6 的表达量在其他组织间差异不显著($P > 0.05$), *GdauCP*7 在头部的表达水平显著高于在体壁和脂肪体中的($P < 0.05$); *GdauCP*5 在体壁中表达量最高,其他组织间表达量差异不显著($P > 0.05$)(图 3)。

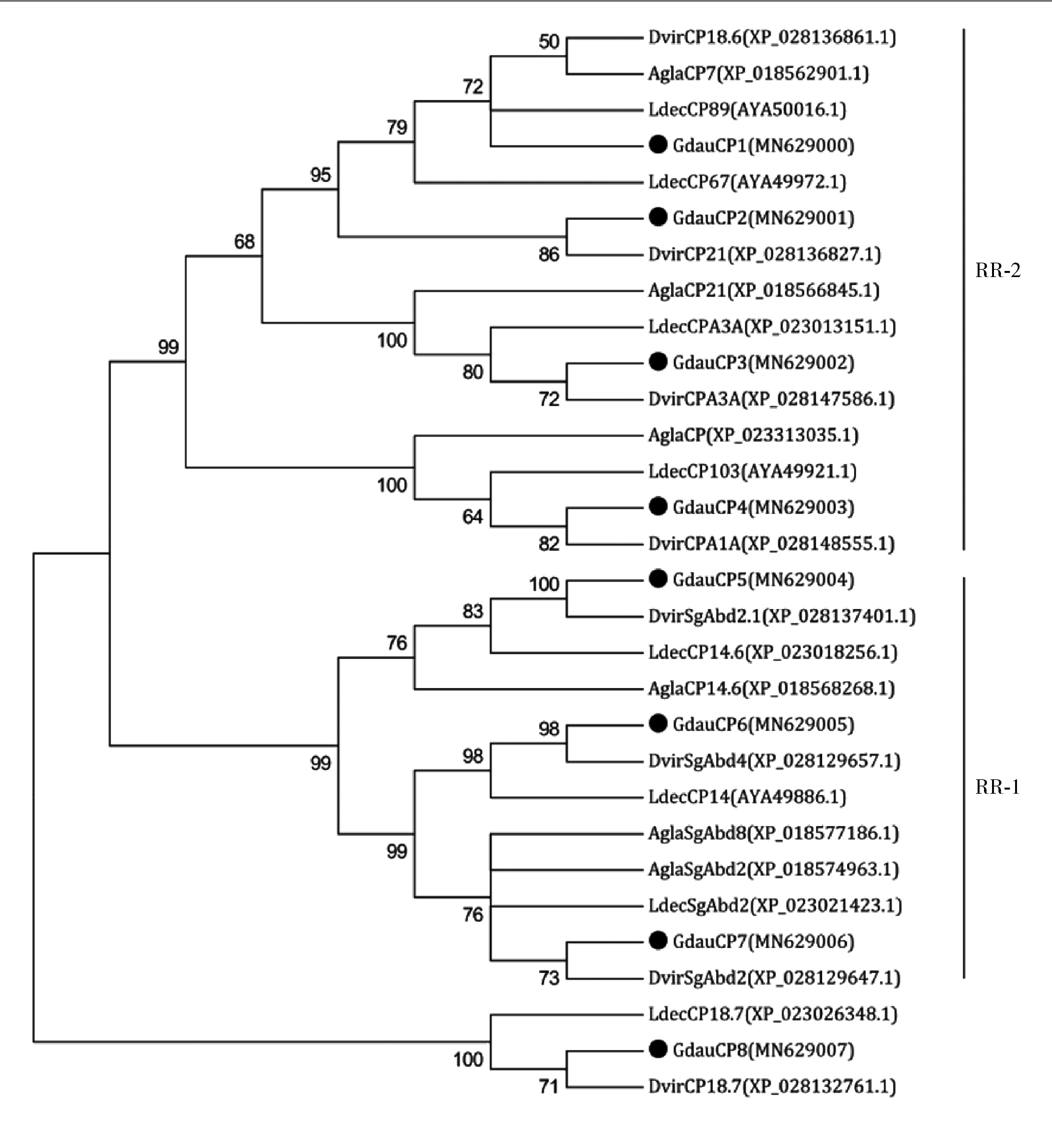


图 1　基于氨基酸序列的沙葱萤叶甲及其他昆虫表皮蛋白系统进化树(邻接法, 1 000 次重复)

Fig. 1　Phylogenetic tree of cuticular proteins from *Galeruca daurica* and other insects based on the amino acid sequences (neighbor-joining method, 1 000 replicates)

CPs 来源物种 Origin species of CPs：Ldec：马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata*；Dvir：玉米根萤叶甲 *Diabrotica virgifera virgifera*；Agla：光肩星天牛 *Anoplophora glabripennish*.

3　讨论

表皮蛋白是昆虫体壁的重要成分,昆虫表皮的形成和发育过程离不开表皮蛋白的参与,其中分布最广、数量最多的家族是 CPR 家族,包括 RR-1, RR-2 和 RR-3 等 3 个亚家族,其含有一个 Rebers & Riddiford 基序(R&R Consensus)(Rebers and Riddiford, 1988)。我们从沙葱萤叶甲幼虫和成虫的转录组数据中,共筛选出 134 条注释为表皮蛋白的 unigene 序列,通过构建系统发育树,本研究选取不同分支上 8 条具有完整 ORF 的代表性表皮蛋白基因进行原核表达、序列分析及表达谱分析。结构域和系统进化分析表明,GdauCP1 –4 属于 RR-2 亚家族,GdauCP5 –7 属于 RR-1 亚家族,GdauCP8 与马铃薯甲虫 LdecCP18.7 和玉米根萤叶甲 DvirCP18.7 一样未确定类型。系统进化分析(图 1)表明,除 GdauCP1 最先与马铃薯甲虫 LdecCP89 聚为一支,其他 7 个 GdauCP 蛋白均首先与玉米根萤叶甲表皮蛋白聚为一支。说明沙葱萤叶甲与玉米根萤叶甲亲缘关系最近,这与它们的分类地位相一致。

表皮蛋白基因在昆虫不同发育阶段或不同组织部位具有不同的表达模式,意味着其可能具有不同的功能(刘晓健等, 2019)。在家蚕 *Bombyx mori* 翅原基中,RR-1 表皮蛋白基因在化蛹之前和之后表达,RR-2 表皮蛋白基因在化蛹当天表达,表明 RR-1

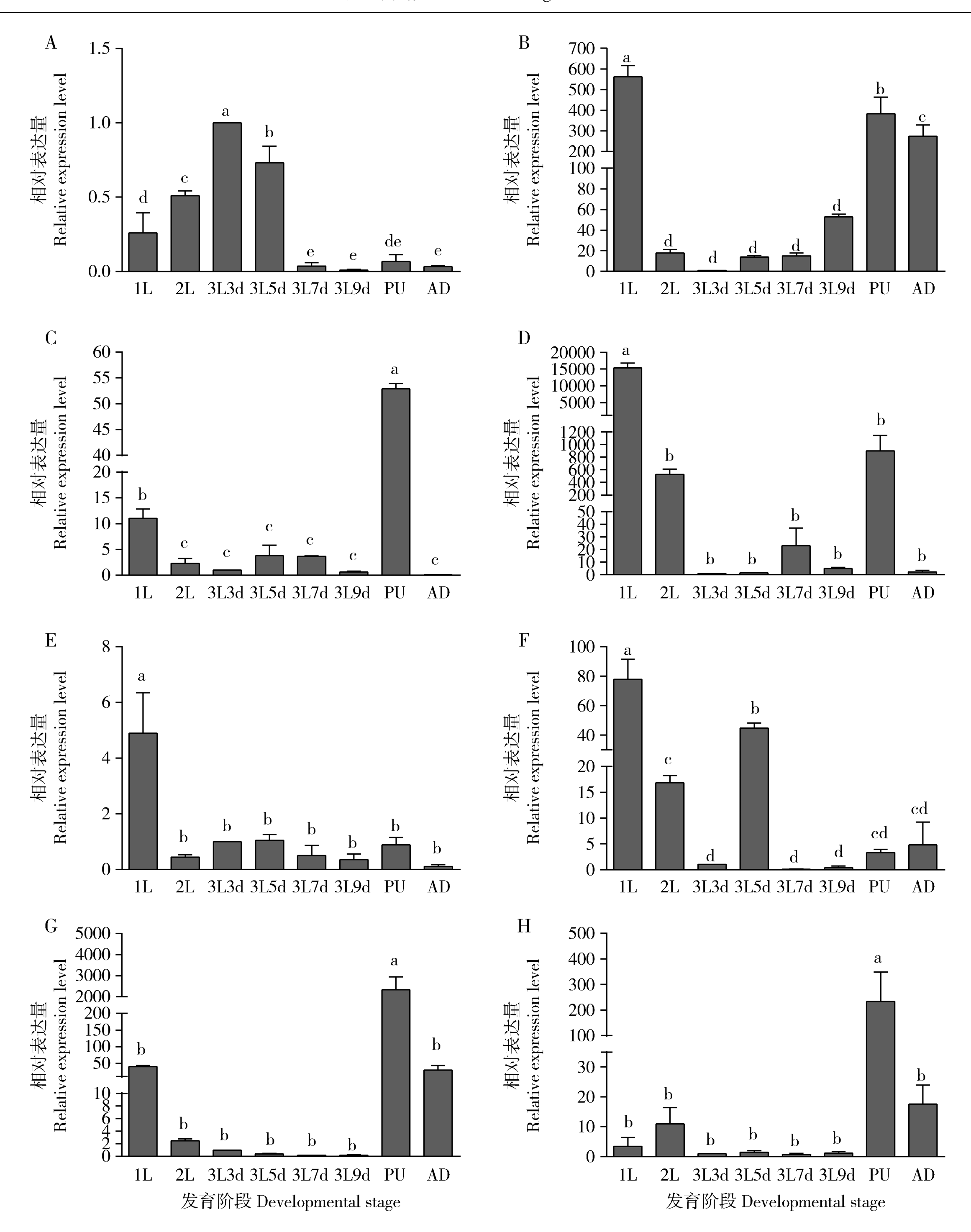


图 2　沙葱萤叶甲表皮蛋白基因 *GdauCP*1 – 8 在不同发育阶段的表达分析

Fig. 2　Expression profiles of *GdauCP*1 – 8 at different developmental stages of *Galeruca daurica*

A: *GdauCP*1; B: *GdauCP*2; C: *GdauCP*3; D: *GdauCP*4; E: *GdauCP*5; F: *GdauCP*6; G: *GdauCP*7; H: *GdauCP*8. 1L: 1 龄幼虫 1st instar larva; 2L: 2 龄幼虫 2nd instar larva; 3L3d: 3 龄第 3 天幼虫 Day-3 3rd instar larva; 3L5d: 3 龄第 5 天幼虫 Day-5 3rd instar larva; 3L7d: 3 龄第 7 天幼虫 Day-7 3rd instar larva; 3L9d: 3 龄第 9 天幼虫 Day-9 3rd instar larva; PU: 蛹 Pupa; AD: 成虫 Adult. 图中数据为平均数 ± 标准误;柱上不同字母代表不同发育阶段间基因表达量差异显著($P<0.05$, Duncan 氏新复极差法)。Data in the figure are mean ± *SE*, and different letters above bars indicate significant differences in the gene expression level among different developmental stages ($P<0.05$, Duncan's new multiple range method).

和 RR-2 表皮蛋白基因在家蚕翅原基内外表皮构建中具有不同的功能(Shahin *et al*., 2016, 2018)。在本研究中,8 个表皮蛋白基因在沙葱萤叶甲不同发育阶段表达模式不同。*GdauCP*4 – 6 在 1 龄幼虫中高度表达,特别是 *GdauCP*4 约为对照 3 龄第 3 天幼虫中表达量的 15 000 倍(图 2: D),可能在 1 龄幼虫表皮形成过程中起着重要作用。然而,中红侧沟茧蜂 *Microplitis mediator* 大多数表皮蛋白基因表达量

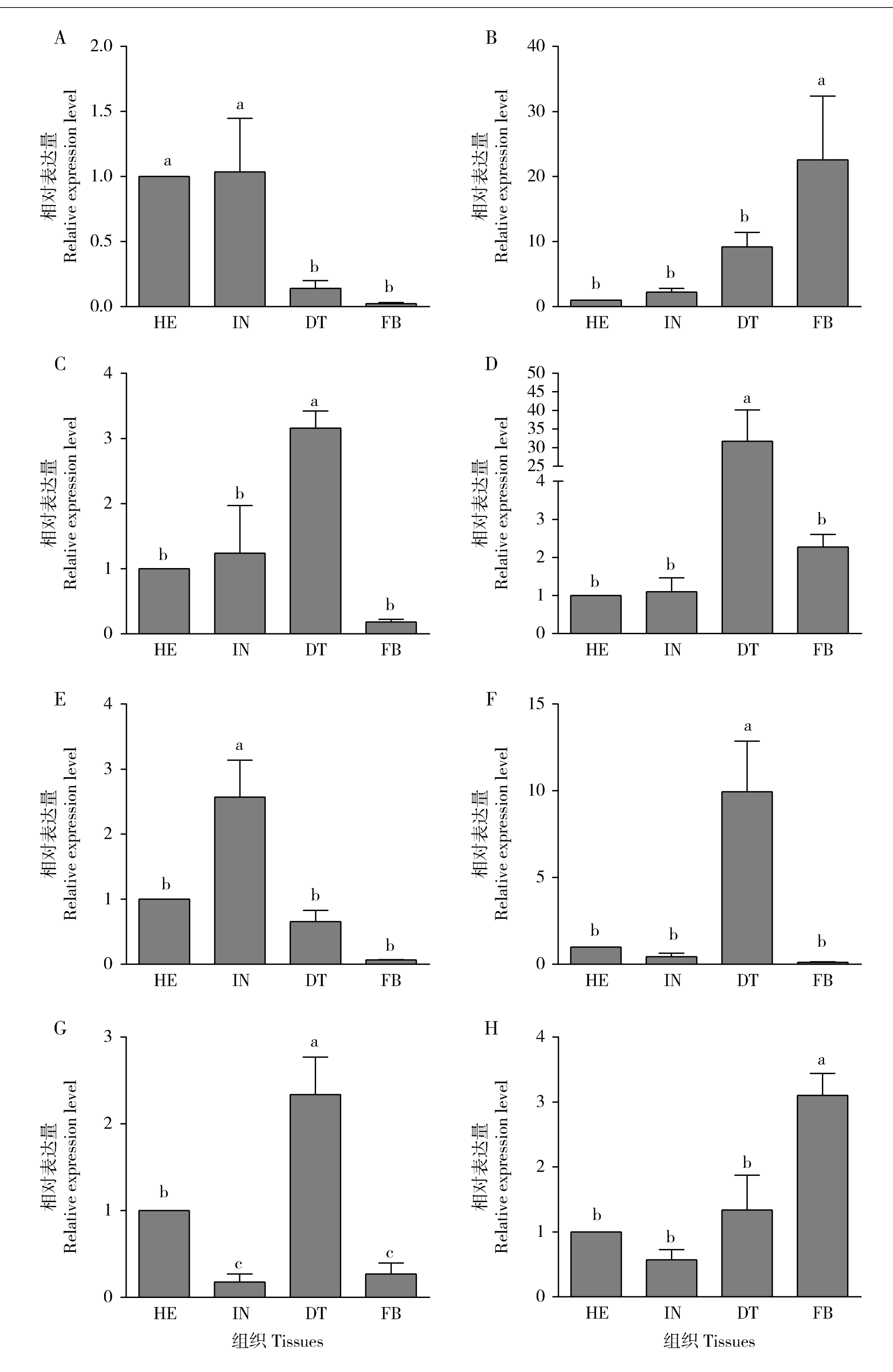


图 3　沙葱萤叶甲表皮蛋白基因 *GdauCP*1 -8 在 3 龄幼虫不同组织中的表达分析

Fig. 3　Expression profiles of *GdauCP*1 -8 in different tissues of the 3rd instar larvae of *Galeruca daurica*

A: *GdauCP*1; B: *GdauCP*2; C: *GdauCP*3; D: *GdauCP*4; E: *GdauCP*5; F: *GdauCP*6; G: *GdauCP*7; H: *GdauCP*8. HE: 头部 Head; IN: 体壁 Integument; DT: 消化道 Digestive tract; FB: 脂肪体 Fat body. 图中数据为平均数 ± 标准误;柱上不同字母代表基因表达量在不同组织间差异显著($P<0.05$, Duncan 氏新复极差法)。Data in the figure are mean ± *SE*, and different letters above bars indicate significant differences in the gene expression level among different tissues ($P<0.05$, Duncan's new multiple range method).

随幼虫龄期的增加而升高(Volovych *et al*., 2019)。*GdauCP*7 和 *GdauCP*8 在蛹期的表达量最高,分别约为对照的2 000 和200 倍(图2: G, H),可能与蛹期表皮形成或羽化有关。除 *GdauCP*2 在成虫中表达量较高外,其他 *GdauCP* 基因在成虫中均低表达(图2: B)。转录组学分析也表明,马尾松毛虫 *Dendrolimus punctatus* 绝大多数表皮蛋白基因在成虫期低表达,只有少数在成虫期高表达(Yang *et al*., 2017),但松墨天牛 *Monochamus alternatus* 表皮蛋白基因 *MoalICP* 在成虫中表达量最高(许雯等, 2014)。贾盼等(2019)研究发现,飞蝗 *Locusta migratoria* 表皮蛋白基因 *LmAbd*-2 在各个龄期内表皮形成时期呈周期性高表达,可能与表皮的合成和沉积有关。在本研究中,虽然对3 龄幼虫期也进行了不同日龄的划分,但未发现类似现象。可能与昆虫或表皮蛋白种类有关,也可能与发育阶段划分不够细致有关。今后应将1 龄幼虫、2 龄幼虫和蛹期进行更细致的划分,以确定沙葱萤叶甲表皮蛋白基因表达是否也有类似现象。

沙葱萤叶甲表皮蛋白基因组织特异性表达分析表明,不同 *GdauCP* 表达模式不同。*GdauCP*1 在沙葱萤叶甲3 龄幼虫头部和体壁中表达量最高(图3: A),家蚕表皮蛋白 *BmCPAP3-G* 也具有类似的表达模式(张薇薇等, 2017)。*GdauCP*5 在3 龄幼虫体壁中高度表达,而在其他组织中低表达(图3: E)。飞蝗 *LmAbd*-2 也在体壁中高表达而在其他组织中低表达,在飞蝗蜕皮过程中参与内表皮的形成(贾盼等, 2019)。*GdauCP*2 和 *GdauCP*8 在沙葱萤叶甲3 龄幼虫脂肪体中的表达量明显高于其他组织中的(图3: B, H),Majerowicz 等(2017)在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的研究中也获得了相同的结果。*GdauCP*3, *GdauCP*4, *GdauCP*6 和 *GdauCP*7 在沙葱萤叶甲3 龄幼虫消化道中的表达量最高(图3: C, D, F, G),飞蝗的2 个表皮蛋白基因 *Obst-D* 和 *Obst-E* 也主要在消化道中表达(王燕等, 2015)。

近年来 RNAi 技术的快速发展,极大地促进了昆虫基因功能的研究。目前已有人应用该项技术研究了赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*(Arakane *et al*., 2012)和褐飞虱 *Nilaparvata lugens*(马艳等, 2013; Lu *et al*., 2018; Pan *et al*., 2018)表皮蛋白基因的功能,表明表皮蛋白基因在昆虫表皮的形成过程中起着重要作用。这些研究为后续深入挖掘沙葱萤叶甲表皮蛋白基因的功能具有重要的参考价值。昆虫表皮蛋白生物学功能的解析,不仅可以为深入认识昆虫表皮发育机制提供参考,而且可以为开发害虫防治新技术提供理论依据。

参考文献(References)

Andersen SO, Hojrup P, Roepstorff P, 1995. Insect cuticular proteins. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 25(2): 153-176.

Arakane Y, Lomakin J, Gehrke SH, Hiromasa Y, Tomich JM, Muthukrishnan S, Beeman RW, Kramer KJ, Kanost MR, 2012. Formation of rigid, non-flight forewings (elytra) of a beetle requires two major cuticular proteins. *PLoS Genet*., 8(4): e1002682.

Cornman RS, Willis JH, 2010. Structural cuticular proteins from arthropods: annotation, nomenclature, and sequence characteristics in the genomics era. *Insect Mol. Biol*., 40(3): 189-204.

Dittmer NT, Hiromasa Y, Tomich JM, Lu N, Beeman RW, Kramer KJ, Kanost MR, 2012. Proteomic and transcriptomic analyses of rigid and membranous cuticles and epidermis from the elytra and hindwings of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *J. Proteome Res*., 11(1): 269-278.

Futahashi R, Okamoto S, Kawasaki H, Zhong YS, Iwanaga M, Mita K, Fujiwara H, 2008. Genome-wide identification of cuticular protein genes in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 38(12): 1138-1146.

Hao X, Zhou XR, Pang BP, Zhang ZR, Bao X, 2015. Morphological and biological characteristics of *Galeruca daurica* Joannis (Coleoptera: Chrysomelidae). *Acta Agrest. Sin*., 23(5): 1106-1108. [昊翔, 周晓榕, 庞保平, 张卓然, 包祥, 2015. 沙葱萤叶甲的形态特征和生物学特性研究. 草地学报, 23(5): 1106-1108]

Ioannidou ZS, Theodoropoulou MC, Papandreou NC, Willis JH, Hamodrakas SJ, 2014. CutProtFam-Pred: detection and classification of putative structural cuticular proteins from sequence alone, based on profile hidden Markov models. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 52(1): 51-59.

Jia P, Zhang J, Yang Y, Liu WM, Zhang JZ, Zhao XM, 2019. Expression and function analysis of endocuticle structural glycoprotein gene *LmAbd*-2 in *Locusta migratoria*. *Sci. Agric. Sin*., 52(4): 651-660. [贾盼, 张晶, 杨洋, 刘卫敏, 张建珍, 赵小明, 2019. 飞蝗内表皮结构糖蛋白基因 *LmAbd*-2 的表达与功能分析. 中国农业科学, 52(4): 651-660]

Karouzou MV, Spyropoulos Y, Iconomidou VA, Cornman RS, Hamodrakas SJ, Willis JH, 2007. *Drosophila* cuticular proteins with the R&R Consensus: annotation and classification with a new tool for discriminating RR-1 and RR-2 sequences. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 37(6): 754-760.

Liu J, Li S, Li W, Peng L, Chen Z, Xiao Y, Guo H, Zhang J, Cheng T, Goldsmith MR, Arunkumar K, Xia Q, Mit K, 2019. Genome-wide annotation and comparative analysis of cuticular protein genes in the noctuid pest *Spodoptera litura*. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 110: 90-97.

Liu XJ, Liu WM, Zhao XM, Zhang JZ, Ma EB, 2019. Progress in the study of insect cuticle development and prospects for future research.

Chin. J. Appl. Entomol., 4(1): 625 - 638.［刘晓健，刘卫敏，赵小明，张建珍，马恩波，2019. 昆虫表皮发育研究进展及展望. 应用昆虫学报，4(1): 625 - 638］

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method. *Methods*, 25(4): 402 - 408.

Lu JB, Luo XM, Zhang XY, Pan PL, Zhang CX, 2018. An ungrouped cuticular protein is essential for normal endocuticle formation in the brown planthopper. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 100(1): 1 - 9.

Ma Y, Hao PY, Lu CF, Yu XP, 2013. Molecular cloning and function analysis of cuticular protein gene *NlICP* in the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae). *Acta Entomol. Sin.*, 56(11): 1244 - 1251.［马艳，郝培应，陆潮峰，俞晓平，2013. 褐飞虱表皮蛋白基因 *NlICP* 的克隆及功能研究. 昆虫学报，56(11): 1244 - 1251］

Majerowicz D, Calderon-Fernandez GM, Alves-Bezerra M, De Paula IF, Cardoso LS, Juarez MP, Atella GC, Gondim KC, 2017. Lipid metabolism in *Rhodnius prolixus*: lessons from the genome. *Gene*, 596(5): 27 - 44.

Pan PL, Ye YX, Lou YH, Lu JB, Cheng C, Shen Y, Moussian B, Zhang CX, 2018. A comprehensive omics analysis and functional survey of cuticular proteins in the brown planthopper. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 115(20): 5175 - 5180.

Rebers JE, Riddiford LM, 1988. Structure and expression of a *Manduca sexta* larval cuticle gene homologous to *Drosophila* cuticle genes. *J. Mol. Biol.*, 203(2): 411 - 423.

Shahin R, Iwanaga M, Kawasaki H, 2016. Cuticular protein and transcription factor genes expressed during prepupal-pupal transition and by ecdysone pulse treatment in wing discs of *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol.*, 25(2): 138 - 152.

Shahin R, Iwanaga M, Kawasaki H, 2018. Expression profiles of cuticular protein genes in wing tissues during pupal to adult stages and the deduced adult cuticular structure of *Bombyx mori*. *Gene*, 646(1): 181 - 194.

Shan Y, Zhang Z, Zhou X, Wu Y, Pang B, 2019. Molecular cloning of a cuticular protein gene *GdAbd* from *Galeruca daurica* (Coleoptera: Chrysomelidae) and its response to temperature stress. *J. Plant Prot.*, 46(3): 514 - 521.［单艳敏，张卓然，周晓榕，乌英嘎，庞保平，2019. 沙葱萤叶甲表皮蛋白基因 *GdAbd* 的克隆及对温度胁迫的响应. 植物保护学报，46(3): 514 - 521］

Tan Y, Zhou XR, Pang BP, 2017. Reference gene selection and evaluation for expression analysis using qRT-PCR in *Galeruca daurica* (Joannis). *Bull. Entomol. Res.*, 107(3): 359 - 368.

Volovych O, Lin Z, Du J, Jiang H, Zou Z, 2019. Identification and temporal expression profiles of cuticular proteins in the endoparasitoid wasp, *Microplitis mediator*. *Insect Sci.*, https://doi.org/10.1111/1744-7917.12711.

Wang Y, Li DQ, Liu XJ, Li T, Ma EB, Fan RJ, Zhang JZ, 2015. Molecular characterization and RNAi-based functional analysis of *Obstructor* family genes in *Locusta migratoria*. *Sci. Agric. Sin.*, 48(1): 73 - 82.［王燕，李大琪，刘晓健，李涛，马恩波，范仁俊，张建珍，2015. 飞蝗表皮蛋白 *Obstructor* 家族基因的分子特性及基于 RNAi 的功能分析. 中国农业科学，48(1): 73 - 82］

Willis JH, 2010. Structural cuticular proteins from arthropods: annotation, nomenclature, and sequence characteristics in the genomics era. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 40(3): 189 - 204.

Xu W, Luo LL, Wu HJ, Wei CM, Lin T, 2014. Cloning and expression profiling of a cuticular protein gene in *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Acta Entomol. Sin.*, 57(5): 515 - 521.［许雯，罗淋淋，吴华俊，韦春梅，林同，2014. 松墨天牛表皮蛋白基因的克隆及表达分析. 昆虫学报，57(5): 515 - 521］

Yang CH, Yang PC, Zhang SF, Shi ZY, Kang L, Zhang AB, 2017. Identification, expression pattern, and feature analysis of cuticular protein genes in the pine moth *Dendrolimus punctatus* (Lepidoptera: Lasiocampidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 83: 94 - 106.

Zhang WW, Dong ZM, Zhang Y, Zhang XL, Zhang SY, Zhao P, 2017. Expression pattern and chitin-binding mode analyses of cuticle protein BmCPAP3-G in the silkworm (*Bombyx mori*). *Sci. Agric. Sin.*, 50(9): 1723 - 1733.［张薇薇，董照明，张艳，张晓璐，张守亚，赵萍，2017. 家蚕表皮蛋白 BmCPAP3-G 的表达特征及其与几丁质的结合特性. 中国农业科学，50(9): 1723 - 1733］

（责任编辑：马丽萍）